

TREBALL DE FI DE GRAU

Assaig de les propietats funcionals dels aliments en cultius cel·lulars

Anna Gascon Nogueras
Grau en Ciència i Tecnologia dels Aliments



Dirigit per: Anna Bassols Teixidó

Universitat Autònoma de Barcelona, 22 de gener de 2014

ÍNDIX

1. Introducció	5
2. Tipus d'assaigs i mecanismes de funcionament	7
2.1. Citotoxicitat/genotoxicitat	7
2.1.1. Mesura de la proliferació cel·lular mitjançant fluorescència DAPI	7
2.1.2. Tinció amb colorant i recompte de cèl·lules al microscopi	7
2.1.3. Assaig de reducció metabòlica de l'MTT	7
2.2. Activitat anticancerígena	8
2.2.1. Fragmentació del DNA	8
2.2.2. Determinació de la proliferació cel·lular	8
2.3. Activitat antioxidant	9
2.3.1. Assaig de l'Activitat Antioxidant Cel·lular (CAA)	9
2.3.2. Detecció de ROS mitjançant microscòpia de fluorescència	9
2.4. Efecte antiinflamatori	10
2.5. Característiques generals dels assaigs:	10
3. Exemple “Initial in vitro toxicity testing of funcional foods rich in catechins and anthocyanins in human cells”	12
4. Visió actual sobre el tema	14
4.1. Avantatges	14
4.2. Inconvenients	14
4.3. Aplicacions a la indústria	15
5. Conclusions	16
6. Bibliografia	18
7. Annexos	19
7.1. Treball experimental	19
7.1.1. Objectiu	19
7.1.2. Materials i mètodes	19
7.1.3. Resultats i Discussió	21
7.1.4. Conclusions	22

LLISTAT D'ABREVIATURES

ABAP. 2,2'-azobis(2-amidinopropà) dihidroclorít

DAPI. 4',6-diamina-2-fenilindola dihidroclorur

DCF. Diclorofluoresceïna

DCFH. 2',7'-diclorofluorescina

DCFH-DA. 2',7'-diclorofluorescin diacetat

MTS. 3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol

MTT. Bromur de 3-(4,5 dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazòlic

ROS. d'espècies reactives d'oxigen

t-BHP. Hidroperòxid de tert-butil

1. INTRODUCCIÓ

L'assaig amb cultius cel·lulars cada vegada pren més importància en el món de la recerca i el desenvolupament de nous productes amb propietats funcionals destinats a l'alimentació humana. És per aquest motiu que els objectius d'aquest treball són, per una banda, presentar els mètodes més freqüentment utilitzats per dur a terme l'assaig de les propietats funcionals dels aliments mitjançant cultius cel·lulars i, per altra, fer un estudi experimental de la citotoxicitat de la sacarina i la sacarosa utilitzant cèl·lules procedents de carcinoma de colon humà (Caco-2).

L'origen dels cultius cel·lulars es remunta al segle XIX, com un mètode per l'estudi del comportament de les cèl·lules animals. Actualment s'entén per cultiu cel·lular el conjunt de tècniques que permeten el desenvolupament de les cèl·lules *in vitro*, mantenint al màxim les seves propietats fisiològiques, bioquímiques i genètiques. Es distingeixen diversos tipus de cultius cel·lulars, procedents d'una àmplia gamma de teixits i organismes diferents.

El funcionament dels cultius cel·lulars es basa en el manteniment i el creixement de cèl·lules animals d'organismes eucariotes pluricel·lulars fora del cos, en recipients especialment dissenyats i sota condicions precises de temperatura, humitat, nutrició i lliures de contaminació. Les tècniques dels cultius cel·lulars han permès als científics l'ús de cultius de cèl·lules per dur a terme estudis experimentals i assaigs biològics de molts tipus.

Un model experimental és aquell que està dissenyat per estudiar un o diversos paràmetres. Existeixen diferents tipus de models experimentals. Tenim els models *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*.

Els estudis *in vitro* són els més senzills i consisteixen en un conjunt d'experiments al laboratori, que es duen a terme fora de l'organisme viu. Permeten estudiar un determinat mecanisme d'acció, una variable o un paràmetre, minimitzant els factors externs. Els estudis *ex vivo*, també tenen lloc fora de l'organisme, però dins d'un teixit viu. Aquest teixit es manté viu en un ambient artificial (experimental) fora de l'organisme. I els estudis *in vivo* són el conjunt d'experiments que s'efectuen directament sobre l'organisme viu.

Tot i que l'estudi amb animals és imprescindible, els models *in vitro* proporcionen una avaluació valuosa sobre les substàncies que es podran descartar o no, per una caracterització posterior mitjançant un model *in vivo*.

Cada un d'aquests estudis aporten diferent informació complementària i la combinació dels tres models experimentals ens pot proporcionar molta informació sobre qualsevol fenomen fisiològic o patològic.

Com més complex és el model, millor es correlaciona amb els valors en humans, però també és més car i més difícil de dur a terme.

Els assaigs en cultius cel·lulars són de gran importància i necessaris per tal d'avaluar les activitats tòxiques i beneficioses dels aliments, i per ajudar a elaborar els seus mecanismes d'acció. A més, tenen una gran significació biològica, ja que encara que no puguin predir per complet els canvis que es produeixen a l'organisme, ajuden a estimar el percentatge de l'aliment o component d'aquest capaç de causar un efecte beneficiós o toxicològic en l'ésser humà.

Es selecciona com a sistema biològic una línia cel·lular específica, avaluant així, la influència de l'aliment sobre l'aparició de canvis en aquestes cèl·lules. Hi ha una àmplia gamma de línies cel·lulars

utilitzades durant l'elaboració d'aquests assaigs, tractant-se així de cèl·lules primàries, cèl·lules modificades genèticament, cèl·lules immortals, cèl·lules en diferents etapes de transformació, cèl·lules en diferents etapes de la diferenciació i cèl·lules mare, entre d'altres.

Podem distingir entre els cultius primaris, que són aquells que s'obtenen a partir de cèl·lules, teixits o òrgans agafats directament d'un organisme, i els cultius secundaris, aquells obtinguts a partir de la resembra de cultius primaris.

Entre les diferents tècniques de cultiu cel·lular existents, les més utilitzades són el cultiu en monocapa, el cultiu en suspensió i el cultiu en suspensió de cèl·lules adherides a partícules (microcarregadors). Durant l'assaig experimental del treball es faran cultius en monocapa.

Els protocols que se segueixen durant l'assaig són els establerts per l'European Collection of Cell Culture (ECACC). A més, els sistemes s'han de dur a terme d'acord amb les normes generals de les "Bones pràctiques de cultiu cel·lular" (Balls et al., 2006).

A causa de la gran importància que tenen avui en dia aquests assaigs i el relleu que estan agafant com a substituïts d'altres mètodes, durant aquest treball s'estudiaran i es desenvoluparan alguns dels sistemes més utilitzats en l'assaig de les propietats funcionals dels aliments mitjançant cultius cel·lulars.

2. TIPUS D'ASSAIGS I MECANISMES DE FUNCIONAMENT

Hi ha un gran nombre d'assaig bastats en línies de cultius cel·lulars a l'hora de determinar les propietats funcionals dels aliments, és per aquest motiu que durant el treball es desenvoluparan només aquells més utilitzats i es descriuran alguns exemples en aliments.

2.1. CITOTOXICITAT/GENOTOXICITAT

La citotoxicitat pot ser definida com la capacitat que posseeixen certs compostos per produir una alteració en les funcions cel·lulars bàsiques que comporta un dany que pot ser detectat (Eisenbrand et al., 2002). I per altra banda, la genotoxicitat és la capacitat d'alguns elements per produir alteració al material genètic per canvis al DNA o a les estructures intracel·lulars vinculades al funcionament o propietats dels cromosomes (Leon et al., 2013).

La majoria de les proves de mesura de citotoxicitat *in vitro* mesuren la necrosi. No obstant això, un mecanisme de mort cel·lular igual d'important és l'apoptosi.

Els criteris que s'utilitzen a l'hora de fer la valoració de les proves de toxicitat cel·lular es basen en la ruptura de la barrera de permeabilitat cel·lular, en la reducció de la funció mitocondrial, en els canvis en la morfologia cel·lular i els canvis en la replicació cel·lular.

Els assaigs més utilitzats són:

2.1.1. Mesura de la proliferació cel·lular mitjançant fluorescència DAPI

L'estudi de citotoxicitat es fa mesurant les cèl·lules supervivents. Com a marcador indirecte s'utilitza la proliferació cel·lular, es visualitza el DNA mitjançant la fixació i la permeabilització de les cèl·lules gràcies a l'addició de metanol i 4',6-diamina-2-fenilindola dihidroclorur (DAPI) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemanya). Amb l'addició de DAPI s'aconsegueix una tinció fluorescent que tenyeix el DNA dels nuclis de les cèl·lules vives de color blau, és un indicador de les cèl·lules que han sobreviscut. Finalment es quantifiquen fent una anàlisi de fluorescència (Fruhworth et al., 2006; Gleit et al., 2003).

2.1.2. Tinció amb colorant i recompte de cèl·lules al microscopi

Els mètodes de tinció cel·lular més freqüentment utilitzats són els d'exclusió cel·lular, on s'utilitza una substància capaç de travessar la membrana plasmàtica i tenyir les cèl·lules. Les cèl·lules vives presenten la capacitat d'excloure el colorant activament dels seus citoplasmes. S'utilitzen diversos colorants, però el més comunament utilitzat és el Blau de Tripà (Gleit et al., 2003).

Una altra tècnica de tinció és aquella basada en la incorporació del colorant per les cèl·lules vives, aquest és el cas del Roig Neutre. A mesura que la cèl·lula va perdent viabilitat a causa de l'acció del compost que s'està analitzant, el colorant s'allibera al medi. Només les cèl·lules viables són capaces de retenir el colorant al seu interior. Es mesura seguidament la quantitat de Roig Neutre que continua dins de la cèl·lula (Norton, 2000).

2.1.3. Assaig de reducció metabòlica del Bromur de 3-(4,5 dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazòlic (MTT)

El mètode de reducció metabòlica d'MTT es basa en la capacitat de mesurar el nombre de cèl·lules presents al cultiu, mitjançant la formació d'un compost acolorit que és degut a una reacció que té lloc en els mitocondris de les cèl·lules viables. L'MTT és captat per les cèl·lules i reduït per l'enzim

succínic deshidrogenasa mitocondrial a la seva forma insoluble, formazà. El producte de la reacció (formazà), característic pel seu color blau, queda retingut en les cèl·lules que el poden alliberar si es solubilitzen (Figura 1). D'aquesta forma, es valora la quantitat d'MTT reduït mitjançant un mètode colorimètric. I així és com s'avalua la funcionalitat mitocondrial de les cèl·lules tractades. La quantitat de cèl·lules vives és proporcional a la quantitat de formazà produït (Meca et al., 2010).

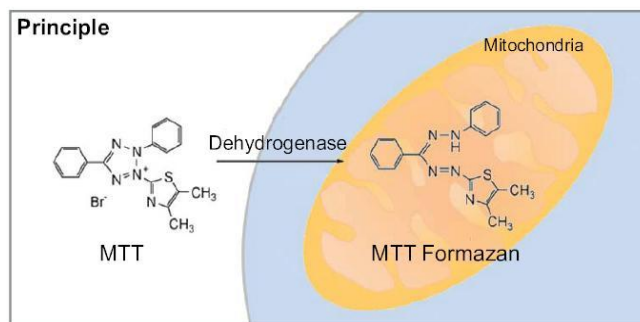


Figura 1: Principi del funcionament de la reducció de l' MTT a formazà en les cèl·lules viables.

2.2. ACTIVITAT ANTICANCERÍGENA

L'objectiu és avaluar l'efecte anticancerigen que tenen certs components presents als aliments davant d'altres substàncies tòxiques capaces de provocar mutacions en les línies cel·lulars o bé, inhibir la proliferació de cèl·lules tumorals.

Molts dels assaigs utilitzats són els mateixos que s'empren a l'hora de mesurar la citotoxicitat perquè el que s'avalua és el nombre de cèl·lules viables.

Els mètodes més utilitzats per determinar l'activitat anticancerígena són:

2.2.1. Fragmentació del DNA

La determinació de la fragmentació del DNA es fa mitjançant l'electroforesi en gel de cèl·lules individuals o *assaig cometa*. Aquest, és freqüentment utilitzat per mesurar el dany en el DNA de les cèl·lules. En la majoria d'estudis, s'utilitzen els limfòcits de sang perifèrica com a model cel·lular.

El fonament d'aquest assaig radica en les ruptures produïdes en el material genètic. Es determina el dany oxidatiu normalment causat pel t-BHP (hidroperòxid de tert-butil), que és un inductor del dany al DNA en cèl·lules. El t-BHP genera fragments que aparenten ser la cua d'un cometa després d'una electroforesi, on el cap és el nucli i la cua és el DNA fragmentat. La longitud i la intensitat de la cua depenen del nombre de ruptures que s'han produït (Fruhirth et al. 2006; Ramos et al. 2008).

2.2.2. Determinació de la proliferació cel·lular

L'estudi de la proliferació cel·lular és una manera de determinar la funció protectora de certs compostos presents als aliments sobre la proliferació cel·lular, amb l'objectiu de conèixer les dosis de l'aliment capaç d'inhibir significativament el creixement de les cèl·lules tumorals.

Aquest assaig es fa mitjançant el mètode de la reducció del bromur de l'MTT, o amb la seva variant, el 3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol (MTS) (Lee et al., 2012), després es llegeix l'absorbància en cèl·lules. Si el cultiu mostra menys proliferació cel·lular en presència del compost a estudiar, ens indicarà que aquest té propietats anticancerígenes ja que actua com a inhibidor del creixement (Wijesinghe et al., 2013).

2.3. ACTIVITAT ANTIOXIDANT

Per tal de determinar l'activitat antioxidant dels aliments, primer cal sotmetre al cultiu cel·lular a substàncies que indueixen l'estrès oxidatiu. Les substàncies més freqüentment utilitzades i millor caracteritzades són el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i el t-BHP. Dos compostos capaços d'induir eficaçment la mort cel·lular i causar dany oxidatiu al DNA, lípids de membrana i altres biomolècules (S. Ramos et al., 2005).

2.3.1. Assaig de l'Activitat Antioxidant Cel·lular (CAA)

Els antioxidants s'uneixen a la membrana cel·lular i/o passen a través de la membrana per entrar dins la cèl·lula. 2',7'-diclorofluorescina diacetat (DCFH-DA) difon dins la cèl·lula, on esterase cel·lulars en degraden una part, per formar una compost més polar 2',7'-diclorofluorescina (DCFH) que queda atrapat dins la cèl·lula. Les cèl·lules es tracten amb 2,2'-azobis(2-amidinopropà) dihidroclorid (ABAP), que s'utilitza com a font oxidant ja que és un generador de radicals peroxil. Els radicals peroxil formats són capaços de difondre dins les cèl·lules i, també, atacar la membrana cel·lular per produir més radicals i oxidar el DCFH intracel·lular. Quan el DCFH s'oxida es forma diclorofluoresceïna (DCF) que és un compost fluorescent que ens indica el grau d'oxidació cel·lular. A menor fluorescència, major poder antioxidant del compost analitzat. (Wolfe & Liu, 2007) (Figura 2).

Els antioxidants prevenen la oxidació del DCFH i dels lípids de membrana i disminueixen la formació de DCF.

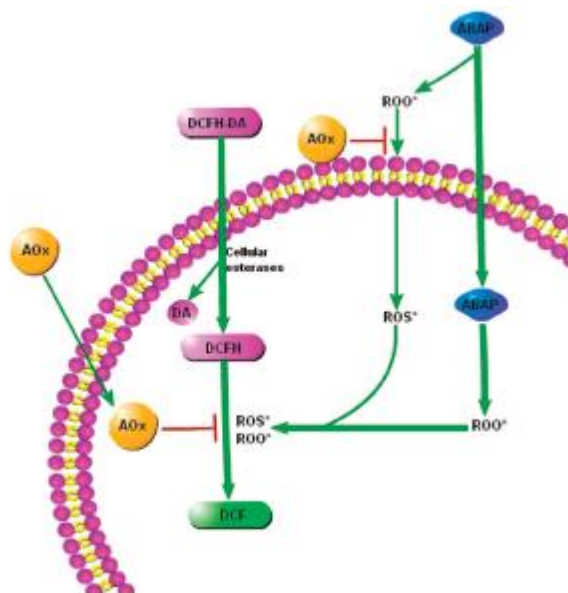


Figura 2: Principi de l'assaig CAA (Wolfe & Liu, 2007).

2.3.2. Detecció de ROS (Reactive oxygen species) mitjançant microscòpia de fluorescència

Una manera de determinar l'activitat antioxidant d'un compost és estudiant el dany produït per l'estrès cel·lular, aquest normalment és degut a un desequilibri entre les concentracions d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i els mecanismes de defensa antioxidants que posseeix cada cèl·lula.

Els radicals lliures juguen un paper important en el dany tissular, aquestes molècules són generades com a conseqüència dels processos d'oxidació, que es defineixen com la transferència d'un electró d'un àtom a un altre.

Els assaigs més utilitzats a l'hora de determinar l'activitat antioxidant es basen en l'exposició de les cèl·lules a t-BHP (substància responsable de l'estrès oxidatiu cel·lular (Zhang et al., 2013)) i la posterior avaluació de la capacitat del compost en qüestió per prevenir la mort cel·lular, el dany al DNA, la generació intracel·lular d'espècies reactives de l'oxigen i l'obertura de porus a la membrana mitocondrial. La determinació final es fa mitjançant la mesura de fluorescència.

2.4. EFECTE ANTIINFLAMATORI

Una de les maneres més habituals d'avaluar l'efecte antiinflamatori és mitjançant la mesura de citoquines proinflamàtores (IL-6 i IL-8) produïdes per les cèl·lules i observar com la producció d'aquestes citoquines disminueix gràcies al compost de l'aliment en qüestió.

Els cultius cel·lulars es tracten amb una substància inflamatòria (un exemple són els oxiesterols) que indueix la síntesi de les citoquines (IL-6 i IL-8) i per altra banda, amb el compost o aliment amb propietats antiinflamàtores que es vol estudiar. Si aquest compost té un efecte antiinflamatori, impedirà de manera significativa l'expressió gènica i la síntesi d'aquestes citoquines (Biasi et al., 2013; Panaro et al., 2012; Sergent et al., 2012).

Passat un temps d'exposició, es realitza una mesura de l'expressió dels gens de IL-6 i IL-8 mitjançant RT-PCR i/o de la concentració d'aquestes citoquines mitjançant ELISA. D'aquesta manera, es quantifica la síntesi de les citoquines proinflamàtores induïdes mitjançant la barreja d'oxiesterols i per tant, es determina l'eficàcia antiinflamatòria del compost a estudiar.

2.5. CARACTERÍSTIQUES GENERALS DELS ASSAIGS:

En els diferents assaigs exposats s'hi poden distingir quatre etapes fonamentals:

1. Caracterització de les dosis citotòxiques d'un compost actiu o extracte d'un aliment.
L'objectiu d'aquesta etapa és definir les dosis de la mostra que siguin tòxiques per les cèl·lules en cultiu, per posteriorment utilitzar aquelles dosis no tòxiques en la caracterització de l'efecte protector de la mostra.
2. Suplementació de les cèl·lules amb dosis no citotòxiques de la mostra.
3. Inducció del dany, del qual l'aliment o el seu extracte en reduirà els efectes.
4. Determinació de la protecció exercida per la mostra.

No a tots els estudis es duen a terme totes quatre etapes.

És molt important realitzar sempre una prova control paral·lela a l'estudi i sotmesa a les mateixes condicions que la resta d'estudis per tal de garantir uns resultats objectius i fiables.

Les línies cel·lulars més utilitzades d'origen humà són:

- Cèl·lules de carcinoma hepàtic: HepG2
- Cèl·lules d'adenocarcinoma de colon: Caco-2, HT29
- Cèl·lules de leucèmia mieloide: U937, HL60
- Cèl·lules de múscul vascular llis: A7r5
- Cèl·lules de càncer de coll uterí: HeLa
- Cèl·lules de carcinoma de mama: MDA
- Cèl·lules de pulmó fetal: MRC-5

I les provinents d'altres espècies animals són:

- Cèl·lules d'ovari:
 - De hàmmster xinès: CHO
- Cèl·lules de ronyó:
 - De mico verd: VERO
 - De hàmmster: BHK-21
 - De conill: RK
 - De porc: PK-15
- Cèl·lules de múscul vascular llis:
 - De rata: VSCM

3. EXEMPLE “INITIAL IN VITRO TOXICITY TESTING OF FUNCIONAL FOODS RICH IN CATECHINS AND ANTHOCYANINS IN HUMAN CELLS”

És habitual estudiar més d'un paràmetre dins d'un mateix estudi, de tal manera que les tècniques vistes fins ara s'apliquen combinades per poder extreure resultats més representatius i semblants a la realitat. L'estudi “Initial in vitro toxicity testing of functional foods rich in catechins and anthocyanins in human cells” (Glei, M., Matuschek, M., Steiner, C., Böhm, V., Persin, C., & Pool-Zobel, B. L. (2003). *Toxicology in Vitro*, 17(5-6), 723–729. doi:10.1016/S0887-2333(03)00099-7) n'és un exemple, i a continuació se'n presentaran els continguts.

Els antocians són un grup de flavonoids polifenòlics que es troben en alguns aliments d'origen vegetal. Estan relacionats en la prevenció de malalties vinculades a l'estrès oxidatiu, gràcies a les seves propietats antioxidants. A més, també actuen intracel·lularment reduint l'H₂O₂ (inductor del trencament de les cadenes de DNA).

En aquest estudi, els autors utilitzen les cèl·lules de còlon humà HT29 clon 19A i les tracten amb extractes d'aigua de te verd (ric en catequines) i de suc de pastanagues negres (ric en antocians). Els tres paràmetres que s'estudien són la proliferació cel·lular, la citotoxicitat i la genotoxicitat.

En primer lloc, es fa un estudi de la proliferació cel·lular mitjançant el mètode per fluorimetria, DAPI. Després es realitza un estudi de citotoxicitat, per tal de determinar el dany causat pels dos compostos en qüestió sobre el DNA cel·lular. Per dur a terme l'estudi de citotoxicitat, primer es realitza una assaig basat en la tinció amb Blau de Tripà i en segon lloc, es du a terme un *assaig cometa*.

Els resultats de l'estudi mostren que quan les cèl·lules HT29 es tracten amb concentracions superiors a 45 µM d'extractes de pastanagues negres, la viabilitat cel·lular es veu reduïda, mostrant clarament un efecte tòxic (Figura 3). Per contra, els extractes d'aigua de te verd no mostren cap efecte aparent sobre la viabilitat cel·lular en cap de les concentracions assajades.

Quant a la proliferació cel·lular i la genotoxicitat, tant un extracte com l'altre mostren el mateix efecte. En el cas de l'estudi de proliferació cel·lular, tenen un clar efecte inhibidor (Figura 4), i en l'estudi de genotoxicitat, els dos extractes presenten toxicitat ja que són inductors del dany genètic (Figura 5).

Per altra banda, resultats de l'estudi demostren que certes concentracions de catequines i d'antocians poden presentar propietats antioxidants eficients ja que prevenen el dany del DNA induït per l'H₂O₂.

També demostren que els efectes que tenen aquests extractes són diferents quan les cèl·lules es tracten només amb cianidines o quan aquestes es sotmeten als extractes complets de suc de pastanagues negres. El tractament només amb cianidines disminueix significativament la genotoxicitat de l'H₂O₂, per contra, el mateix tractament amb els extractes de suc de pastanagues negres, potencia l'efecte de l'H₂O₂ sobre el dany del DNA.

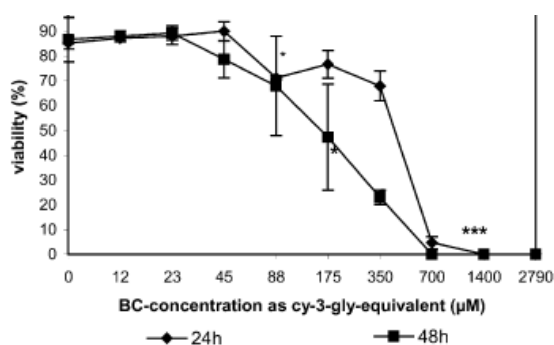


Figura 3: Viabilitat cel·lular després de 24h o 48h d'incubació amb extractes de suc de pastanagues negres per exclusió amb Blau de Tripà, $P < 0.005$, *** $P < 0.001$ * $P < 0.005$, $n=3$.

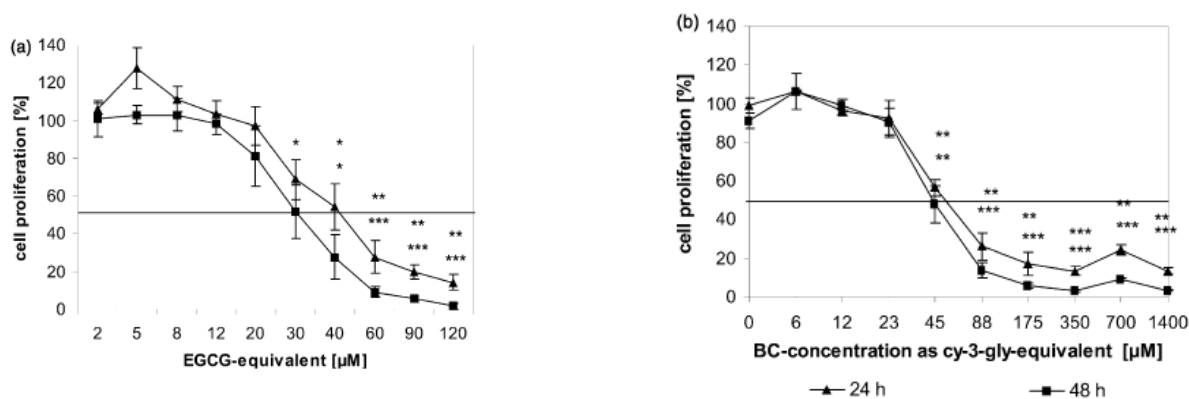


Figura 4: Proliferació cel·lular, mesurada en funció del contingut en DNA, després de 24h i 48h incubats amb extractes d'aigua de te verd (a) i de suc de pastanagues negres (b). Els dos extractes fan disminuir significativament la població cel·lular (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ t-test en comparació al control).

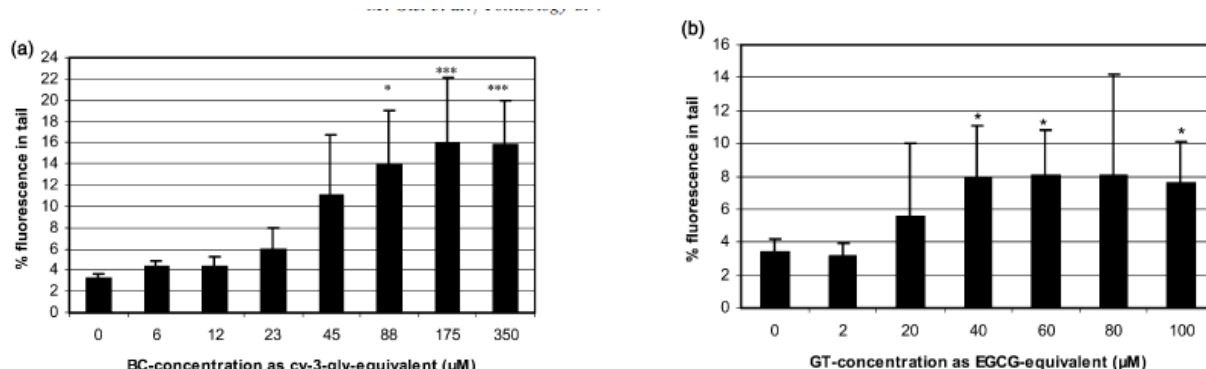


Figura 5: Dany al DNA després de 24 h de tractament amb extractes de suc en base de pastanagues negres (a) i d'aigua de te verd (b). Els extractes de suc en base de pastanagues negres ($P < 0.01$, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, $n = 3$) i d'aigua de te verd (* $P < 0.05$ t-test en comparació al control, $n = 4$) induïxen significativament el truncament de les cadenes de DNA.

Com a conclusió final de l'estudi, es vol remarcar la gran importància de l'elaboració d'estudis de toxicitat a l'hora d'utilitzar qualsevol extracte com a suplement o additiu alimentari, ja que no és suficient confiar en les troballes i estudis anteriors que parlen dels efectes beneficiosos, sense tenir en compte una avaluació de la toxicitat.

Mitjançant aquests estudis, és possible la determinació de les concentracions de substàncies tòxiques dels extractes de menjar funcional dels quals, les activitats beneficioses ja han estat caracteritzades prèviament. A més, és possible comparar respostes entre les diverses mostres o dins de la mateixa mostra dels components que la formen, la qual cosa també és molt important perquè els efectes dels ingredients alimentaris beneficiosos per la salut, poden ser emascarats quan s'acompanyen de components tòxics.

4. VISIÓ ACTUAL SOBRE EL TEMA

4.1. AVANTATGES

Els assaigs amb cultius cel·lulars són útils en moltes situacions ja que ens proporcionen informació molt més detallada sobre les interaccions dels constituents alimentaris amb cèl·lules humanes i d'altres espècies animals.

Els avantatges d'utilitzar cultius cel·lulars són els següents:

Control precís del medi ambient. En un cultiu es poden controlar les condicions fisicoquímiques (pH, temperatura, pressió osmòtica, pressió parcial de l'oxigen i el diòxid de carboni), i fisiològiques (hormones, factors de creixement, densitat cel·lular, etc.).

Caracterització i homogeneïtat de la mostra. Una mostra de teixit és sempre heterogènia. En canvi, les línies cel·lulars cultivades que s'utilitzen són homogènies, és a dir, la seva morfologia i la seva composició és uniforme. Es poden obtenir rèpliques idèntiques de cada subcultiu i les característiques de la línia cel·lular es conserven durant generacions. Això facilita molt el tractament estadístic dels resultats.

Avaluació de múltiples compostos. Es poden utilitzar per un gran ventall de compostos, però són especialment adequats per l'estudi de productes químics de baix pes molecular com additius alimentaris, aromes, contaminants i residus de medicaments.

Efectes combinats. També és possible avaluar els efectes de mescles complexes per estudiar la combinació dels efectes d'una manera més enfocada.

Qüestions ètiques. La investigació biomèdica suposa el sacrifici cada any de molts animals d'experimentació. El cultiu cel·lular no pot substituir sempre l'assaig *in vivo* però és una alternativa vàlida en moltes situacions. Per obtenir un cultiu cel·lular primari és possible que s'hagi de sacrificar algun animal, però amb aquests, es poden fer assaigs d'un elevat nombre d'estudis experimentals que, en altres circumstàncies, suposarien el sacrifici de desenes o centenars d'animals d'experimentació.

Economia. Els models animals i els estudis en humans són costosos, aquesta és una raó més per la qual és interessant realitzar una avaluació prèvia de les propietats funcionals dels aliments mitjançant assaigs de cultius cel·lulars per, posteriorment, poder procedir a la seva avaluació *in vivo* si és necessari. A més, es garanteix l'accés directe de la substància a les cèl·lules sense que es dilueixi i sense que pateixi cap tipus de modificació metabòlica. El cost dels assaigs clínics es redueix considerablement i es pot fer un major nombre de proves.

4.2. INCONVENIENTS

La majoria d'inconvenients són deguts al fet que les cèl·lules s'aïllen del seu medi natural i, per tant, això implica una supervivència menor, un desequilibri de l'activitat metabòlica, una manca d'interacció cèl·lula - cèl·lula i una absència de comunicació amb el teixit. Un altre causant d'aquestes limitacions és que les línies cel·lulars que s'utilitzen a l'hora de fer el cultiu són generalment cèl·lules tumorals i, per contra, les cèl·lules implicades en el procés natural de l'ésser humà, deriven de teixits sans.

És per això que, a l'hora d'utilitzar cultius cel·lulars trobem els següents inconvenients:

Validesa del model. Un cultiu cel·lular és un disgregat cel·lular d'un teixit i es diferencia d'aquest en què:

- S'ha perdut l'organització espacial tridimensional pròpia del teixit.
- S'han perdut les interaccions entre els diferents tipus cel·lulars i entre les cèl·lules i la matriu extracel·lular. A més, quan es forma una línia cel·lular només es conserven un o dos tipus cel·lulars (aquells que proliferen a major velocitat).
- S'han perdut els components sistemàtics implicats en la regulació de la homeòstasis *in vivo*, especialment els sistemes nerviós i endocrí.
- La pressió parcial d'oxigen és reduïda ja que no hi ha un transportador d'oxigen com l'hemoglobina. Per tant, l'energia s'obté principalment a través de la glicòlisi ja que el cicle de Krebs juga un paper molt reduït.

Inestabilitat. Quan es programa la línia cel·lular, les cèl·lules perden les característiques fenotípiques pròpies del teixit. La relació entre les cèl·lules cultivades i les cèl·lules originals dels teixits pot perdre's, això és degut que moltes línies cel·lulars contínues són inestables i adopten una dotació cromosòmica aneuploide, la qual cosa afecta tant a la seva velocitat de creixement com a la seva capacitat per diferenciar-se. És possible trobar diferències significatives en la línia cel·lular d'una generació a la següent.

Tècnica complexa i cara. El cultiu de cèl·lules animals s'ha de realitzar en estrictes condicions d'asèpsia perquè el seu creixement és molt més lent que el dels contaminants habituals. A més, les cèl·lules animals són incapaces de mantenir-se vives en absència d'una barreja complexa de nutrients al plasma o al fluid intersticial. Tot això condiciona els instruments requerits i el grau de preparació dels personal encarregat dels cultius, així com el cost de l'estudi que com a conseqüència serà més elevat que en altres assaigs.

4.3. APLICACIONS A LA INDÚSTRIA

Actualment, l'ús de cultius cel·lulars en la determinació de propietats funcionals dels aliments està molt enfocat en laboratoris de recerca i investigació. Tot i així, els estudis on s'utilitzen més aquests mètodes són aquells basats en la investigació de les propietats funcionals dels aliments d'origen vegetal i els seus extractes. Un clar exemple és la investigació de l'activitat antioxidant dels extractes de plantes utilitzades en l'elaboració de te (Gawlik-Dziki et al., 2013; Lee et al., 2012; Sergent et al., 2012).

Tot i així, ja hi ha algunes grans indústries del sector de l'alimentació que han començat a utilitzar-los pel desenvolupament de nous productes amb apropiats funcionals. Un exemple és Lipton, una empresa que es dedica a la producció de Te (http://www.lipton.com.au/about/about_lipton/scientific_publications). Lipton ha tret diversos estudis en els quals investiga l'activitat antioxidant del te en cultius cel·lulars, un exemple és l'estudi de l'efecte que tenen les catequines del te verd en cèl·lules musculars llises vasculars (VSMC) (Chyu et al., 2004).

5. CONCLUSIONS

Els estudis *in vitro* mitjançant cultius cel·lulars han estat la base de molts avenços en la història de la ciència. Això ha estat gràcies a la gran varietat d'aplicacions que ofereixen aquests dins de les diferents branques de la ciència. Algunes dels usos més importants fora del camp de l'alimentació són l'elaboració de productes de cosmètica, medicaments, productes sanitaris o substàncies químiques.

En el món de l'alimentació, els assaigs de les propietats funcionals dels aliments mitjançant cultius cel·lulars són cada dia més abundants i ofereixen una informació més precisa. Tot i així, no hem d'oblidar que aquestes proves estan basades en la utilització de models que permeten estudiar un procés aïllat que en l'ésser viu es troba dins d'un sistema complex, el qual implica múltiples interrelacions. És per aquest motiu que la interpretació dels mètodes exposats s'ha de fer considerant aquesta realitat.

És possible pensar que en un futur proper es desenvoluparan models *in vitro* més avançats, proporcionant una informació més completa de cada un dels fenòmens descrits durant el treball, ja que cada vegada aquests models estan prenent més importància, estenent així el seu camp d'aplicació dins del sector alimentari.

6. BIBLIOGRAFIA

- Balls, M., Coecke, S., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Stokes, W. (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP). *ALTEX: Alternativen zu Tierexperimenten*, 23 Suppl, 270–273.
- Biasi, F., Guina, T., Maina, M., Cabboi, B., Deiana, M., Tuberoso, C. I., Leonarduzzi, G. (2013). Phenolic compounds present in Sardinian wine extracts protect against the production of inflammatory cytokines induced by oxysterols in CaCo-2 human enterocyte-like cells. *Biochemical pharmacology*, 86(1), 138–45. doi:10.1016/j.bcp.2013.03.024
- Chyu, K.-Y., Babbidge, S. M., Zhao, X., Dandillaya, R., Rietveld, A. G., Yano, J., Shah, P. K. (2004). Differential effects of green tea-derived catechin on developing versus established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation*, 109(20), 2448–53. doi:10.1161/01.CIR.0000128034.70732.C2
- Eisenbrand, G., Pool-zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B. J., Boobis, A., Kleiner, J. (2002). Methods of in vitro toxicology, 40, 193–236.
- Fruhwrth, G. O., Moumtzi, A., Loidl, A., Ingolic, E., & Hermetter, A. (2006). The oxidized phospholipids POVPC and PGPC inhibit growth and induce apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1761(9), 1060–1069. doi:10.1016/j.bbali.2006.06.001
- Gawlik-Dziki, U., Świeca, M., Sułkowski, M., Dziki, D., Baraniak, B., & Czyż, J. (2013). Antioxidant and anticancer activities of Chenopodium quinoa leaves extracts - in vitro study. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 57, 154–60. doi:10.1016/j.fct.2013.03.023
- Glei, M., Matuschek, M., Steiner, C., Böhm, V., Persin, C., & Pool-Zobel, B. L. (2003). Initial in vitro toxicity testing of functional foods rich in catechins and anthocyanins in human cells. *Toxicology in Vitro*, 17(5-6), 723–729. doi:10.1016/S0887-2333(03)00099-7
- Lee, M.-S., Kim, J.-I., Utsuki, T., Park, N.-G., & Kim, H.-R. (2012). Cytoprotective effects of phlorofucofuroeckol A isolated from Ecklonia stolonifera against tacrine-treated HepG2 cells. *Fitoterapia*, 83(6), 1060–7. doi:10.1016/j.fitote.2012.05.007
- Leon, I. E., Porro, V., Di Virgilio, a L., Naso, L. G., Williams, P. a M., Bollati-Fogolín, M., & Etcheverry, S. B. (2013). Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of an oxidovanadium(IV) complex with the flavonoid silibinin against osteosarcoma cells. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 59–74. doi:10.1007/s00775-013-1061-x
- Meca, G., Ruiz, M. J., Soriano, J. M., Ritieni, a, Moretti, a, Font, G., & Mañes, J. (2010). Isolation and purification of enniatins A, A(1), B, B(1), produced by Fusarium tricinctum in solid culture, and cytotoxicity effects on Caco-2 cells. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 56(3), 418–424. doi:10.1016/j.toxicon.2010.04.008
- Panaro, M. A., Cianciulli, A., Carofiglio, V., Acquafredda, A., & Cavallo, P. (2012). Anti-inflammatory effects of resveratrol occur via inhibition of lipopolysaccharide-induced NF-κB activation in Caco-2 and SW480 human colon cancer cells. *British Journal of Nutrition*. doi:10.1017/S0007114511007227

- Ramos, a a, Lima, C. F., Pereira, M. L., Fernandes-Ferreira, M., & Pereira-Wilson, C. (2008). Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: evaluation by the comet assay. *Toxicology letters*, 177(1), 66–73. doi:10.1016/j.toxlet.2008.01.001
- Ramos, S., Alía, M., Bravo, L., & Goya, L. (2005). Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2). *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 1271–1280. doi:10.1021/jf0490798
- Sergent, T., Joly, A., Hendrickx, A., Melillo de Magalhães, P., Raas, T., Dessy, S., ... Dupont, I. (2012). Anti-inflammatory effect and modulation of cytochrome P450 activities by *Artemisia annua* tea infusions in human intestinal Caco-2 cells. *Food Chemistry*, 134(2), 864–871. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.195
- Wijesinghe, W. a J. P., Jeon, Y. J., Ramasamy, P., Wahid, M. E. a, & Vairappan, C. S. (2013). Anticancer activity and mediation of apoptosis in human HL-60 leukemia cells by edible sea cucumber (*Holothuria edulis*) extract. *Food Chemistry*, 139(1-4), 326–31. doi:10.1016/j.foodchem.2013.01.058
- Wolfe, K. L., & Liu, R. H. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(22), 8896–8907.
- Zhang, D., Xie, L., Wei, Y., Liu, Y., Jia, G., Zhou, F., & Ji, B. (2013). Development of a cell-based antioxidant activity assay using dietary fatty acid as oxidative stressor. *Food chemistry*, 141(1), 347–56. doi:10.1016/j.foodchem.2013.02.082

BASES DE DADES UTILITZADES:

- *Pubmed*

GESTOR DE LA BIBLIOGRAFIA UTILITZAT:

- *Mendeley*

7. ANNEXOS

7.1. TREBALL EXPERIMENTAL

7.1.1. Objectiu

L'objectiu és establir *in vitro*, les concentracions citotòxiques de la sacarina i la sacarosa mitjançant l'aplicació de diferents dosis d'aquestes, sobre una línia cel·lular procedent de carcinoma de colon humà (Caco-2).

L'assaig es basa en la determinació de les cèl·lules viables mitjançant un colorant, Blau de Metilè. Paral·lelament a l'estudi s'utilitza un control on les cèl·lules creixen en absència de sacarosa o sacarina, per tal de poder obtenir unes conclusions vàlides.

7.1.2. Materials i mètodes

La línia cel·lular Caco-2 és una línia cel·lular derivada del càncer de colon humà i mantinguda com a cultiu continu.

Preparació de les cèl·lules:

1. Medi de cultiu utilitzat: DMEM + 10%FCS + Glutamina + Aminoàcids essencials. Els medis s'atempren a 37°C abans de la seva utilització.
2. Prèvia descongelació de les cèl·lules Caco-2 (a -80°C) i centrifugació a 2000 rpm durant 10 minuts.
3. Etiquetat dels flascons T25 i addició de 4 ml del medi de cultiu.
4. Aspiració del sobrenedant de les cèl·lules centrifugades amb una bomba i una pipeta Pasteur i addició d'1 ml del medi DMEM a les cèl·lules. Resuspensió del pellet de cèl·lules i addició de les cèl·lules del flascó T25.
5. Observació al microscopi.
6. Les cèl·lules creixen en un incubador que es troba a 37°C i atmosfera amb 5% de CO₂. Al llarg dels dies es fa un seguiment del cultiu per assegurar un creixement correcte i l'absència de contaminants. Cada 2-3 dies, el medi es renova per tal d'eliminar les cèl·lules mortes i aportar nous nutrients al cultiu. Si el medi indicador passa de color vermell a taronjós, indicarà una disminució del pH (causada per un elevat creixement cel·lular ja que la glucosa ha passat a àcid làctic). L'eliminació de les cèl·lules flotants es fa aspirant el medi amb pipeta Pasteur connectada a una bomba d'aspiració.
7. Quan les cèl·lules arriben al 90% de confluència, caldrà en primer lloc, desadherir-les del plàstic per tal de poder fer la divisió d'aquestes. Per desadherir les cèl·lules, aquestes es sotmeten a 0.5ml de Tripsina-EDTA a 37°C, 5% CO₂ durant 10 min. Prèviament s'han de rentar les cèl·lules amb DMEM sense FCS, ja que el sèrum conté inhibidors de la tripsina.
8. Una vegada desadherides les cèl·lules, s'inactiva la Tripsina-EDTA afegint medi de cultiu amb sèrum. Cal pipetejar amb compte per tal de disgregar els cúmuls de cèl·lules.
9. El recompte cel·lular es realitza en una càmera de Neubauer: es col·loca una gota de la suspensió de cèl·lules, es compten les cèl·lules que es troben dins de cada quadrat i es fa la mitjana dels quatre quadrats.

1	2
3	4

Quadrat 1: 61 cèl·lules

Quadrat 2: 66 cèl·lules

Quadrat 3: 67 cèl·lules

Quadrat 4: 58 cèl·lules

Mitjana:

63 cèl·lules = 63×10^4 cèl·lules/ml

Com que hi ha 5ml de volum i se li afegeixen 0.5ml de tripsina, s'obté un volum total de 5.5ml. Per tant, el número de cèl·lules totals serà de:

$$63 \times 10^4 \text{ cèl·lules/ml} \times 5.5 \text{ ml} = 346.5 \times 10^4 \text{ cèl·lules}$$

10. Les cèl·lules se suspensen en una placa de 96 pous, dels quals se'n utilitzen 60:

- A cada pou hi ha d'anar 2×10^4 cèl·lules, per tant es necessiten un total de 120×10^4 cèl·lules.

- A cada pou s'hi ha de ficar 100µl. Es necessita així, un total de 6ml per omplir els 60 pous:

$$60 \text{ pous} \times 100 \mu\text{l} = 6000 \mu\text{l} = 6 \text{ ml}$$

- Per tant:

$$63 \times 10^4 \text{ cèl·lules} \rightarrow 1 \text{ ml}$$

$$120 \times 10^4 \text{ cèl·lules} \rightarrow X \text{ ml}$$

$$X = 2 \text{ ml de suspensió de cèl·lules}$$

- A aquests 2ml de cèl·lules, se'ls hi afegeixen 4.5 ml de medi per tal de completar el volum necessari (6.5ml) i es pipetegen 100µl a cada pou.

11. Deixar incubar les cèl·lules a 37°C

Estudi de citotoxicitat:

1. Les cèl·lules han crescut i estan bé, per tant ja es pot dur a terme l'estudi de citotoxicitat de la sacarina i la sacarosa. Es procedeix al canvi del medi de cultiu, aspirant l'antic i inoculant 100µl del nou (DMEM + 10% FCS).
2. Preparació de les solucions de 200mM de sacarosa i de sacarina (366 mg/ml i 670mg/ml respectivament).
3. Preparació de la resta de solucions a partir dels 200mM, de la següent manera:
 - a) Agafar 1ml de la solució 200mM i passar-lo a un altre tub que és on es farà la solució 100mM i acabar-lo d'omplir amb 1ml de medi. Agitar i agafar 1ml de la concentració 100mM i passar-lo a un altre tub per preparar la solució 50mM i així successivament. Fins a preparar totes les solucions.
4. Omplir els pous amb 100 µl de medi segons la següent seqüència, on els requadres taronges representen les concentracions amb sacarina i els liles, la sacarosa. Tal i com s'indica a la taula, els pous dels extrems (quadrats de color blau) no s'omplen. Es fan 5 rèpliques de cada condició.

	0mM (control)	0mM (control)	0mM (control)	0mM (control)	0mM (control)	0mM (control)	0mM (control)	0mM (control)	0mM (control)	0mM (control)	
	12.5mM	12.5mM	12.5mM	12.5mM	12.5mM	12.5mM	12.5mM	12.5mM	12.5mM	12.5mM	
	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM	
	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	
	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM	
	200 mM	200 mM	200 mM	200 mM	200 mM	200 mM	200 mM	200 mM	200 mM	200 mM	

- Una vegada els pous són plens, es fa l'observació en lupa on ja es pot veure com les cèl·lules tractades amb concentracions més elevades de sacarina i sacarosa, 100mM i 200mM, han patit alguns canvis degut al procés d'osmosis cel·lular.
- Incubació dels pous durant 24h.
- Aspiració del medi i rentat amb PBS.
- Addició del colorant Blau de Metilè.
- Deixar incubar 1 hora a 37°C.
- Retirament del colorant i rentat dels pous amb aigua destil·lada.
- Addició de 50µl d'etanol i agitació. Es deixa 20 minuts en repòs.
- Mesura de l'absorbància a 570nm mitjançant un lector ELISA. Una absorbància més alta, indicarà un major nombre de cèl·lules vives.

7.1.3. Resultats i Discussió

Els resultats d'absorbància són els següents:

CONCENTRACIÓ (mM)	ABSORBÀNCIA (SACAROSA)						ABSORBÀNCIA (SACARINA)					
-	0,054	0,054	0,063	0,059	0,057	0,055	0,063	0,061	0,057	0,057	0,063	0,068
0	0,052	0,902	0,903	1,009	0,969	0,696	0,766	0,715	0,800	0,606	0,634	0,058
12.5	0,095	0,802	1,015	0,914	1,086	1,022	0,924	0,954	0,739	0,843	0,700	0,058
25	0,140	1,143	0,814	0,902	1,061	0,825	0,860	0,997	1,108	1,234	0,943	0,063
50	0,067	0,569	0,494	1,166	1,061	0,832	0,939	0,973	1,202	1,269	1,189	0,065
100	0,129	0,759	0,744	0,723	0,615	0,559	0,679	0,720	0,712	0,654	0,547	0,091
200	0,068	0,635	0,604	0,585	0,490	0,520	0,638	0,480	0,192	0,075	0,073	0,076
-	0,064	0,054	0,057	0,097	0,082	0,061	0,062	0,121	0,102	0,081	0,106	0,080

A partir d'aquests resultats, es van calcular les mitjanes i les desviacions estàndard d'aquests valors. La significació estadística de les diferències respecte els controls, es va analitzar mitjançant una t-student (Taula 1).

CONCENTRACIÓ (mM)	SACAROSA		SACARINA	
	$\bar{x} \pm SD$	<i>P</i>	$\bar{x} \pm SD$	<i>P</i>
0	0,896 \pm 0,1206	-	0,704 \pm 0,0832	-
12.5	0,968 \pm 0,111	0.355 (NS)	0,832 \pm 0,111	0.073 (NS)
25	0,949 \pm 0,147	0.548 (NS)	1,028 \pm 0,146	0.003 (<i>P</i> < 0.01)
50	0,824 \pm 0,295	0.629 (NS)	1,114 \pm 0,148	0.001 (<i>P</i> < 0.001)
100	0,680 \pm 0,088	0.012 (<i>P</i> < 0.05)	0,662 \pm 0,070	0.414 (NS)
200	0,567 \pm 0,060	0.001 (<i>P</i> < 0.001)	0,292 \pm 0,255	0.009 (<i>P</i> < 0.001)

Taula 1: Efecte de la sacarosa i la sacarina sobre la viabilitat cel·lular. Es representa en valor d'absorbància. NS (No significatiu).

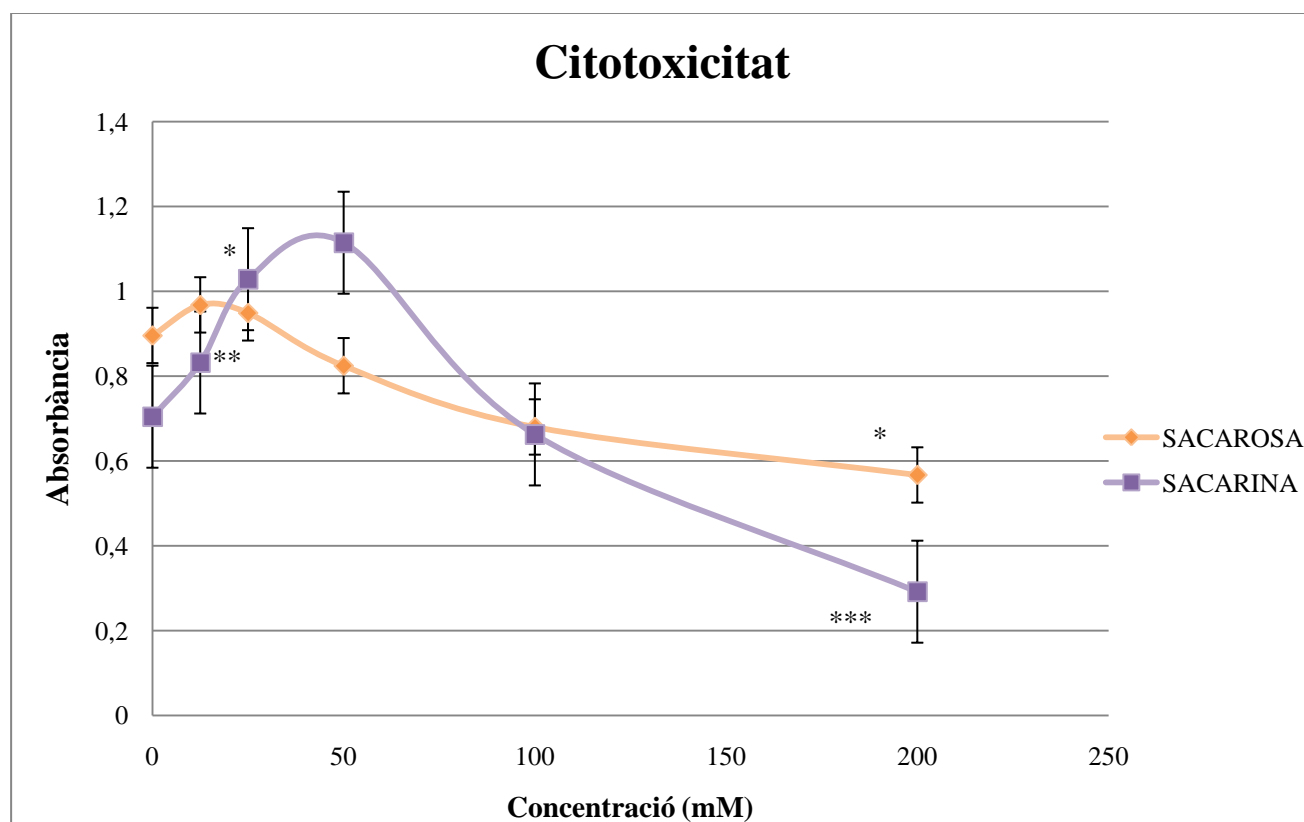


Figura 1: Efecte de la sacarosa i la sacarina en la viabilitat cel·lular. Representació de l'absorbància segons les concentracions de sacarina i sacarosa. A menys absorbància, més citotoxicitat cel·lular (menys cèl·lules viables). $P > 0.05$, $P < 0.05^*$, $P < 0.01^{**}$, $P < 0.001^{***}$.

7.1.4. Conclusions

D'acord amb les condicions estudiades, s'han vist diferències notables entre els pous exposats a sacarosa i aquells exposats a sacarina. Quant a la sacarina, s'ha vist que a partir de concentracions de 12.5mM, comença a ser visible l'efecte inductor de la proliferació cel·lular, ja que s'observa un augment estadísticament significatiu de l'absorbància. A partir de la concentració 50mM, l'absorbància disminueix dràsticament, això és degut a la mort cel·lular, per tant, a concentracions majors de 100mM, la sacarina té afectes citotòxics. Per altra banda, la sacarosa té uns efectes menors

respecte la sacarina i no es veuen efectes significatius fins a 200mM en què s'observa una disminució de la viabilitat cel·lular.

Per tal de poder fer una simulació que ens permeti concloure si aquestes concentracions poden correspondre a una situació aproximada a la real, es va procedir a fer un càlcul molt aproximat de les concentracions reals que es poden assolir *in vivo*.

Sóc conscient que es tracta de càlculs molt aproximats, on l'únic objectiu és fer-se una idea de quin seria l'ordre de concentracions esperades *in vivo*.

Sacarina:

Se suposa un subjecte de 70Kg que pren 5 sobrets de sacarina al dia, cada sobret conté 0.6g. El seu volum sanguini representa entre un 7-8% , per tant, té un volum sanguini de 5L, on el 55% és plasma, és a dir, 2.75L de plasma. Se suposa també que l'absorció de la sacarina és del 100%, de tal manera que al final del dia el subjecte ha ingerit 3g de sacarina. La sacarina té una massa molar de 183.18g/mol, per tant:

$$3g \text{ sacarina} \times \frac{1 \text{ mol}}{183.18g \text{ sacarina}} = 0.0164 \text{ mols sacarina}$$

Durant un dia el subjecte tindrà una concentració al plasma de:

$$\frac{0.0164 \text{ mols sacarina}}{2.75L \text{ plasma}} = 5.955 \times 10^{-3} \text{ M} = \mathbf{5.95 \text{ mM}}$$

Per tant, tot i fer una ingestió de 3g de sacarina al dia no s'arribarien a les concentracions citotòxiques al plasma.

Per tal que la ingestió de sacarina representi un risc per a la salut, aquesta hauria de ser major de 25mM en plasma, aproximadament 4 vegades més la dosi proposada. Per tant, i tenint en compte que això és una conclusió aproximada i que s'haurien de fer més proves experimentals i tests estadístics, es podria concloure que una persona que prengué 20 sobrets de sacarina al dia, aquesta podria comportar efectes perjudicials per a la seva salut.

Sacarosa:

Per altra banda, una persona que consumeix 5 sobrets de sacarosa al dia, la qual cosa correspon a 35 grams de sacarosa ja que cada sobret conté uns 7 grams i partint dels supòsits anteriors, aquest subjecte presentarà una concentració de sacarosa al plasma de:

$$35g \text{ sacarosa} \times \frac{1 \text{ mol}}{342.29 \text{ g sacarosa}} = 0.1023 \text{ mols de sacarosa}$$

$$\frac{0.1023 \text{ mols sacarosa}}{2.75L \text{ plasma}} = 0.0372 \text{ M} = \mathbf{37.2 \text{ mM}}$$

D'acord amb els resultats obtinguts, sabem que la sacarosa no presenta efectes citotòxics fins a concentracions superiors a 100mM, per tant, el consum de 5 sobrets al dia quedaria molt lluny d'aquestes concentracions en plasma.

Per tal que la sacarosa tingués efectes tòxics sobre la persona, es fa el càlcul dels grams de sacarosa que s'haurien d'ingerir per aconseguir una concentració de 100mM en plasma tenint en compte el supòsit anterior:

$$\begin{aligned} 0.1M \times 2.75L \text{ plasma} &= 0.275 \text{ mols de sacarosa} \times \frac{342.29 \text{ grams de sacarosa}}{1 \text{ mol}} \\ &= 94.130 \text{ grams de sacarosa} \end{aligned}$$

Caldria prendre entre 13 i 14 sobrets de sacarosa de 7g al dia perquè aquesta presentés efectes tòxics per a la salut.